

09/786130

PCT/JP98/05186

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

18.11.98

EKU

REC'D 15 JAN 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 9月 1日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第247588号

出願人  
Applicant(s):

株式会社林原生物化学研究所

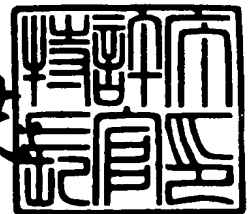
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1998年12月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山田 健志



出証番号 出証特平10-3102030

【書類名】 特許願

【整理番号】 10059901

【提出日】 平成10年 9月 1日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C07K 14/47  
C07K 14/54  
C07K 14/71  
C12N 15/24  
C12N 15/12  
A61K 38/20  
A61K 38/17

【発明の名称】 インターロイキン-18結合蛋白質

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5

    【氏名】 鳥越 角二

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市三野2丁目12番44号

    【氏名】 谷合 まどか

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

    【氏名】 栗本 雅司

【特許出願人】

    【識別番号】 000155908

    【郵便番号】 700

    【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

    【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

    【代表者】 林原 健

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035736

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インターロイキン-18結合蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部け又は一部を含有するインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項2】 部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至31に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有する請求項1に記載のインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項3】 SDS-ポリアリルアミドゲル電気泳動により測定すると、約40,000乃至60,000ダルトンの分子量を示す請求項1又は2に記載のインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項4】 哺乳類の体液から得ることのできる請求項1、2又は3に記載のインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項5】 請求項1乃至4に記載のインターロイキン-18結合蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】 配列表における配列番号32又は33に示すいずれかの塩基配列若しくはその塩基配列に相同的な塩基配列又はそれらの塩基配列に相補的な塩基配列を含有する請求項5に記載のDNA。

【請求項7】 有効成分として、請求項1乃至4に記載のインターロイキン-18結合蛋白質を含有するインターロイキン-18抑制剤。

【請求項8】 有効成分として、請求項1乃至4に記載のインターロイキン-18結合蛋白質を含有する抗感受性疾患剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は新規なサイトカン結合蛋白質、とりわけ、インターロイキン-18結合蛋白質に関する。

【0002】

【従来の技術】

インターロイキン-18（以下、「IL-18」と略記する。）は、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの1種である。特開平8-27189号公報、特開平8-193098号公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第378巻、第6, 552号、88乃至91頁（1995年）に見られるように、IL-18は、発見当初、「インターフェロン- $\gamma$ 誘導因子（IGIF）」と呼称されていたが、その後、シンペイ・ウシオら『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第156巻、4, 274乃至4, 279頁（1996年）における提案にしたがって、「IL-18（インターロイキン-18）」と呼称されるようになった。アンガス・ダブリュ・トムソン編『ザ・サイトカイン・ハンドブック』、第3版、アカデミック・プレス・リミテッド発行、465乃至489頁に記載されているように、成熟型のIL-18は157個のアミノ酸からなり、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロン- $\gamma$ （以下、「IFN- $\gamma$ 」と略記する。）の産生を誘導する性質と、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞そのものの生成を誘導する性質を兼備している。これらの性質ゆえに、IL-18は抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、抗免疫疾患剤などの医薬品として広範な用途が期待され、現在、その実用化を目指して鋭意研究が進められている。

#### 【0003】

前述のとおり、IL-18にかぎらず、サイトカインは、本来、免疫系における情報伝達を担う物質として産生され、分泌される。したがって、IL-18が哺乳類の体内で過剰に産生されたり、外部から過剰に投与されたりすると、免疫系のバランスに偏りを生じ、生体にとって有害な免疫反応を惹起する可能性がある。例えば、特開平10-96730号公報などにみられるように、最近の知見は、慢性関節リウマチを含む自己免疫疾患の患者が、IL-18の体液レベルにおいて、健常者より有意に高いことを示している。このことは、IL-18がある種の疾患の発症に直接又は間接に関与していることを物語っている。したがって、斯界においては、IL-18そのものの生理作用の解明や実用化に加えて、IL-18の生理作用を抑制する物質が一刻も早く解明され、実用化されることが期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、IL-18の生理作用を抑制する性質を有し、医薬品としてヒトを含む哺乳類に適用可能な物質を提供することにある。

【0005】

さらに、この発明の第二の課題は、斯かる物質をコードするDNAを提供することにある。

【0006】

加えて、この発明の第三の課題は、斯かる物質のIL-18抑制剤としての用途を提供することにある。

【0007】

さらに加えて、この発明の第四の課題は、斯かる物質の医薬品としての用途を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者がこれらの課題を解決すべく鋭意研究したところ、IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する物質が哺乳類の体液中に存在することを突き止めた。本発明者がこの物質を分離し、性質・性状を調べたところ、その本質は蛋白質であり、単離された状態でもIL-18に結合し、その生理作用を顕著に抑制することを見出した。さらに、斯くして存在が確認されたIL-18結合蛋白質は、ヒトを含む哺乳類に投与すると、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー疾患を含む、過剰な免疫反応に起因する諸種の疾患の治療・予防に効果を発揮することも見出した。

【0009】

すなわち、この発明は、前記第一の課題を、配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有するIL-18結合蛋白質を提供することにより解決するものである。

【0010】

さらに、この発明は、前記第二の課題を、斯かるIL-18結合蛋白質をコードするDNAを提供することにより解決するものである。

【0011】

加えて、この発明は、前記第三の課題を、有効成分として、斯かるIL-18結合蛋白質を含有するIL-18抑制剤を提供することにより解決するものである。

【0012】

さらに加えて、この発明は、前記第四の課題を、有効成分として、斯かるIL-18結合蛋白質を含有する抗感受性疾患剤を提供することにより解決するものである。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、この発明の実施の形態について説明すると、この発明の蛋白質は、IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する性質と、独特のアミノ酸配列により特徴付けられる。すなわち、この発明のIL-18結合蛋白質は、IL-18に作用させると、IL-18の代表的な生理作用である、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する作用を抑制する。また、この発明のIL-18結合蛋白質は配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含んでなり、例えば、ヒト由来のIL-18結合蛋白質は、部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至23に示すアミノ酸配列の全部又は一部を、また、マウス由来のIL-18結合蛋白質は配列表における配列番号24乃至31に示すアミノ酸配列の全部又は一部をそれぞれ含有する。この発明のIL-18結合蛋白質は、尿や血液などの体液においては、通常、可溶性糖蛋白質として存在し、還元剤存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、「SDS-PAGE」と略記する。）を適用すると、分子量約40,000乃至60,000ダルトンにIL-18結合能を伴う蛋白質のバンドを示す。

【0014】

この発明のIL-18結合蛋白質は、斯かる特徴を指標にして、哺乳類の体液

や細胞から得ることができる。個々の体液としては、血液、リンパ液、腹腔内液、尿などが挙げられ、また、細胞としては、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、単球、顆粒球、リンパ球、神経細胞及びそれらを培養株化して得られる細胞株が挙げられる。経済性を問題にするのであれば、この発明のIL-18結合蛋白質をコードするDNAに組換えDNA技術を適用するのが有利である。この発明のIL-18結合蛋白質をコードするDNAは、配列番号1乃至31に示すアミノ酸配列に基づき哺乳類の遺伝子を検索することにより得ることができる。例えば、この発明のIL-18結合蛋白質をコードするヒト由来のDNAは、通常、配列表における配列番号32に示す塩基配列の全部又は一部を、また、マウス由来のDNAは、通常、配列表における配列番号33に示す塩基配列の全部又は一部をそれぞれ含有する。斯かるDNAにより形質転換した動物及び微生物由来の宿主は、常法にしたがって培養することにより、この発明のIL-18結合蛋白質を高収量で産生する。

【0015】

上記のごとき給源を用いてこの発明のIL-18結合蛋白質を調製するには、体液又は細胞若しくは微生物の培養物を、必要に応じて、超音波などにより破碎した後、生理活性蛋白質を精製するための慣用の方法、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などを単独又は組合せて適用すればよい。

【0016】

ところで、免疫系は、本来、有害な異物から生体を防御するためのものであるが、ときとして、その働きゆえに、却って、生体に有害な結果をもたらすことがある。哺乳類に、例えば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、骨髄などの臓器を移植すると、同種異系抗原に対する拒絶反応により、T細胞が活性化され、リンパ球が増殖したり、炎症が生じることがある。症状の程度こそ違え、同様の現象は、例えば、アレルゲンのように、宿主が固有のものと見做さない異種異系抗原が侵入した場合にも観察される。また、自己免疫疾患においては、本来、固有のものと見



做されるべき成分がアレルギー反応を惹起する。

【0017】

この発明の IL-18 結合蛋白質は、免疫系を活性化する IL-18 に結合することによってその生理作用を抑制する IL-18 抑制剤として機能するので、ヒトを含む哺乳類に投与すると、上記のごとき免疫反応を抑制することが期待される。したがって、この発明でいう感受性疾患とは、拒絶反応及びアレルギー反応を含む免疫反応一般の亢進に起因する疾患を含み、この発明の IL-18 結合蛋白質が直接又は間接に作用して治療及び／又は予防し得るすべての疾患ということになる。個々の感受性疾患としては、例えば、上記のごとき臓器移植に伴う拒絶反応に加えて、活動性慢性肝炎、萎縮性胃炎、自己免疫性溶血性貧血、バセドウ病、パーチェット症候群、CRST 症候群、寒冷凝集素性溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、甲状腺機能亢進症、慢性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、若年性糖尿病、白血球減少症、多発性硬化症、重症筋無力症、発作性寒冷血色素尿症、悪性貧血、多発性結節性動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、シーグレン症候群、交換性眼炎、進行性全身性硬化症、ウェジナー肉芽腫症、HIV 感染症、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症及びハチ毒アレルギーを含む自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患一般が挙げられる。なお、この発明の IL-18 結合蛋白質は、IFN- $\gamma$  の過剰産生や過剰投与などに起因する敗血症ショックの治療・予防にも有効である。斯くして、有効成分として IL-18 結合蛋白質を含有するこの発明の抗感受性疾患剤は、上記のごとき感受性疾患を治療・予防するための抗自己免疫疾患剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗腫瘍剤、免疫抑制剤、増血剤、白血球増多剤、血小板増多剤、鎮痛剤、解熱剤などとして多種多様な用途を有することとなる。

【0018】

この発明の抗感受性疾患剤は、IL-18 結合蛋白質単独の形態はもとより、IL-18 結合蛋白質とそれ以外の生理的に許容される、例えば、補助剤、増量剤、希釈剤、賦形剤、安定剤、防腐剤、免疫助成剤、着色剤、着香剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の 1 又は複数との組成物としての形態をも包

含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、ラクチトールなどの糖質及びクエン酸塩、磷酸塩若しくは炭酸塩を主体とする緩衝剤が、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、アスピリン、フルフェナム酸、メフェナム酸、ジクロフェナック、インドメタシン、トルメチン、イブプロフェン、ケトプロフェン、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、消炎酵素剤、金製剤、クロロキン製剤などの抗炎症剤、FK506、シクロフォスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、サイクロスポリンA、副腎皮質ホルモンなどの免疫抑制剤、さらには、IL-18以外のサイトカインの受容体アンタゴニスト、例えば、インターロイキン-1受容体蛋白質、インターロイキン-2受容体蛋白質、インターロイキン-5受容体蛋白質、インターロイキン-6受容体蛋白質、インターロイキン-8受容体蛋白質及びインターロイキン-12受容体蛋白質に対するそれぞれの抗体、さらには、TNF- $\alpha$ 受容体、TNF- $\beta$ 受容体、インターロイキン-1受容体、インターロイキン-5受容体及びインターロイキン-8受容体に対するそれぞれのアンタゴニストが挙げられる。

【0019】

さらに、この発明の抗感受性疾患剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、IL-18結合蛋白質を、例えば、1回当りの用量又はその整数倍（4倍まで）若しくはその約数（1/40まで）に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、エキス剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、眼軟膏剤、懸濁剤、乳剤、硬膏剤、坐剤、散剤、酒精剤、錠剤、シロップ剤、浸剤、煎剤、注射剤、補輸液、チンキ剤、点眼剤、トローチ剤、軟膏剤、パップ剤、芳香水剤、リニメント剤、リモナーデ剤、流エキス剤及びローション剤が挙げられ、必要に応じて、点鼻剤、鼻噴霧剤、下気道吸入剤、眼科用除法剤、口腔粘膜貼付剤及び浣腸剤としてもよい。この発明の抗感受性疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与してもよく、いずれの場合にも、感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にもよるが、具体的には、患者

の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当り約 $1\mu\text{g}$ /回乃至 $1\text{g}$ /回、通常、約 $10\mu\text{g}$ /回乃至 $100\text{mg}$ /回のIL-18結合蛋白質を1乃至4回/日又は1乃至5回/週の用量で1日乃至半年に互って経口投与するか、あるいは、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

【0020】

以下、実施例に沿ってこの発明の実施の形態を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明がこれらの実施例のみに限定されないことは言うまでもない。なお、この発明による蛋白質のIL-18結合能は、後記実施例においては、次の結合アッセイにより決定される阻害率を指標にして判定した。

【0021】

すなわち、IL-18受容体をコードするDNAをチャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞(ATCC CRL-9618)に導入することによって、IL-18受容体が細胞表面に過剰に発現した効果細胞を調製する。別途、0.1% (w/v) アジ化ナトリウム、0.1% (v/v) ウシ血清アルブミン及び $100\text{mM}$  N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸をそれぞれ含むRPMI-1640培地(pH7.2)を調製し、これをアッセイ用培地とする。次いで、試験区として、アッセイ用培地により適宜希釈した被検試料を $50\mu\text{l}$ とり、これにアッセイ用培地により適宜希釈した $^{125}\text{I}$ 標識IL-18を $50\mu\text{l}$ 加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で1時間振盪した後、アッセイ用培地に細胞密度 $1\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ になるように浮遊させた効果細胞を $50\mu\text{l}$ 加え、 $4^{\circ}\text{C}$ でさらに1時間振盪する。その後、 $1.5\text{ml}$ 容遠心管にジブチルフタレート/ジオクチルフタレート混液(容積比1:1)を $200\mu\text{l}$ とり、その上部に効果細胞の浮遊液を重層し、 $4^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心分離し、吸引により上清を除去した後、細胞残渣を遠心管ごと切り取り、ガンマカウンター(商品名『ARC-300型』、アロカ株式会社製造)により放射能強度を測定した。併行して、 $^{125}\text{I}$ 標識IL-18とともに未標識IL-18を $5\mu\text{g}$ 加える系(非特異的結合区)と、被検試料のみ省略する系(総結合区)をそれぞれ設け、これらを試験区と同様に処置した。そして、試験区、総結合区及び非特異的吸着区において得られ

た放射能強度を数 1 に示す式にそれぞれ代入して阻害率 (%) を計算した。

【0022】

【数 1】

$$\text{阻 害 率 ( \% )} = \frac{\text{総結合区} - \text{試験区}}{\text{総結合区} - \text{非特異的結合区}} \times 100$$

【0023】

【実施例 1】

〈ヒト由来の IL-18 結合蛋白質〉

【0024】

【実施例 1-1】

〈IL-18 結合蛋白質の調製〉

人尿 3 l を膜濃縮した後、20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) に対して 4℃ で 20 時間透析した。透析内液を採取し、これをあらかじめ 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) により平衡化しておいたアフィニティークロマトグラフィー用ゲル (商品名『ウイト・ジャーム・レクチン・セファロース 6MB』、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社販売) 230 ml のカラムに負荷して IL-18 結合蛋白質を吸着せしめ、カラムを 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) により洗浄した後、0.5 M N-アセチル-D-グルコサミンを含有する 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を通液しつつ、カラムからの溶出液を一定量ずつ採取した。

【0025】

各溶出画分の IL-18 結合能を前記結合アッセイにより調べた後、IL-18 結合能が認められた画分を合一し、20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) に対して 4℃ で 16 時間透析した。透析内液を採取し、適宜濃縮した後、あらかじめ 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) により平衡化しておいたイオン交換クロマトグラフィー用ゲル (商品名『TSK-gel DEAE-5PW』、東ソー株式会社製造) 54 ml のカラムに負荷し、塩化ナトリウムの濃度が 100 分間で 0 M から 0.5 M まで直線的に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下にて 20 mM 磷

酸緩衝液 (pH 7.0) を 2 ml / 分の流速で通液し、塩化ナトリウム濃度が 0.2 M 付近で溶出した画分を採取した。

#### 【0026】

この画分を膜濃縮した後、あらかじめ 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) により平衡化しておいたゲル濾過クロマトグラフィー用ゲル (商品名『Hi Load Superdex 200』、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社販売) 20 ml のカラムに負荷し、カラムに 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を通液しつつ、ゲル濾過クロマトグラフィーにおける分子量が 70,000 ダルトン付近の画分を採取した。この新たに得られた画分をあらかじめ 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液により平衡化しておいた逆相クロマトグラフィー用ゲル (商品名『Vydac 214TP54』、サイプレス・インターナショナル株式会社販売) 4 ml に負荷し、アセトニトリル濃度が 0% (v/v) から 90% (v/v) まで直線的に上昇するアセトニトリルの濃度勾配下にてカラムに 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液を通液しつつ、カラムからの溶出液を一定量ずつ分画した。各溶出画分の IL-18 結合能を前記結合アッセイにより調べた後、IL-18 結合能が確認された、アセトニトリル濃度が 70% (v/v) 付近で溶出した画分を採取し、濃縮したところ、ヒト由来の精製 IL-18 結合蛋白質が約 3  $\mu$ g 得られた。

#### 【0027】

その後、この精製 IL-18 結合蛋白質につき、ジチオトレイトール存在下の SDS-PAGE により分子量を測定したところ、約 40,000 乃至 50,000 ダルトンに IL-18 結合能を伴う蛋白質の単一バンドが観察された。また、大麦胚芽レクチンをリガンドとする『ウィート・ジャーム・レクチン・セファロース 6MB』に吸着することは、本例の IL-18 結合蛋白質が糖蛋白質であることを示している。

#### 【0028】

##### 【実施例 1-2】

##### 〈N 末端アミノ酸配列〉

実施例 1-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を遠心濃縮機により

乾固した後、8M尿素及び10mM EDTAをそれぞれ含有する0.1Mトリスー塩酸緩衝液（pH 8.1）に溶解し、窒素気流下、50℃で30分間処理した。次いで、ジチオトレイトールを適量加え、窒素気流下、50℃で2時間還元した後、反応物にモノヨード酢酸を適量加え、室温下、暗所にて30分間反応させてIL-18結合蛋白質をアルキル化した。

【0029】

得られたアルキル化物にジチオトレイトール存在下のSDS-PAGEを適用することによって分子量約40,000乃至50,000ダルトンに相当する蛋白質を分離し、以後、常法にしたがって、分離したIL-18結合蛋白質のバンドを切り出し、抽出した後、プロテインシーケンサー（商品名『473A型』、アプライド・バイオシステムズ社製造）を用いてN末端アミノ酸配列を決定した。その結果、実施例1-1の方法により得たこの発明のIL-18結合蛋白質は、N末端アミノ酸配列として、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含有していることが判明した（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。

【0030】

【実施例1-3】

＜ペプチドマッピング＞

ウルフ・ヘルマンら『アナリティカル・バイオケミストリー』、第224巻、451乃至455頁（1995年）に記載された『イン・ゲル・ダイジェスション法』により、実施例1-2の方法により還元アルキル化したIL-18結合蛋白質のトリプシン消化後及びトリプシン／ペプシン消化後のペプチドマップをそれぞれ作成するとともに、トリプシン消化により得られたペプチド断片1乃至8及びトリプシン／ペプシン消化により得られたペプチド断片9乃至20のアミノ酸配列をそれぞれ決定した。その結果、ペプチド断片1乃至20は、それぞれ、配列表における配列番号3乃至23に示すアミノ酸配列を有していることが判明した（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。このとき得られたペプチドマップを図1に示す。

【0031】

## 【実施例1-4】

## 〈IL-18抑制作用〉

免疫担当細胞及びIL-18として、それぞれ、健常者のリンパ球及び組換え型ヒトIL-18を、また、IFN- $\gamma$ の標準品として米国国立衛生研究所から入手した標準ヒトIFN- $\gamma$  (Gg02-901-530)をそれぞれ用いた以外は、後記実施例3-3におけると同様に試験した。

## 【0032】

その結果、本例のIL-18結合蛋白質が共存すると、ヒトIL-18によるIFN- $\gamma$ 産生の誘導が有意に抑制された。このことは、本例のIL-18結合蛋白質がIL-18の生理作用を抑制することを示している。

## 【0033】

## 【実施例2】

## 〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA〉

ポリ(A)付加ヒト肝臓RNA (クローンテック製) 10 ngに10×PCR緩衝液2  $\mu$ l、25 mM塩化マグネシウム2  $\mu$ l、0.1 Mジチオトレイトール2  $\mu$ l、25 mM dNTPミックス1  $\mu$ l、200単位/ $\mu$ l逆転写酵素(商品名『スーパースクリプトII』、ライフテック・オリエンタル株式会社製造) 1  $\mu$ l及び2.5  $\mu$ Mランダムヘキサマー1  $\mu$ lをそれぞれ加え、滅菌蒸留水で全量を20  $\mu$ lとした。この混合物を0.5 ml容反応管にとり、42℃で50分間、70℃で15分間、この順序で、それぞれインキュベートすることによって逆転写酵素反応させ、第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

## 【0034】

この反応物に体積比で2.5倍量のエタノールと3 M酢酸ナトリウム2  $\mu$ lをそれぞれ加え、-20℃で2時間静置してcDNAを沈澱させた。沈澱を採取し、75% (v/v) 水性エタノールにより洗浄した後、滅菌蒸留水に溶解し、2.5単位/ $\mu$ l DNAポリメラーゼ(商品名『クローンDPfuポリメラーゼ』、ストラタジーン製造) 0.5  $\mu$ l、専用緩衝液10  $\mu$ l及び25 mM dNTPミックス1  $\mu$ lをそれぞれ加え、さらに、センスプライマーとして、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-ACNCC

NGTNWSNCA-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号8に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-TGNGCNARNACNACRTG-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ10 $\mu$ M加え、滅菌蒸留水で全量を100 $\mu$ lとした。この混合物を94℃、40℃及び72℃で、この順序で、それぞれ1分間インキュベートするサイクルを40回繰返してPCR反応させた。

# 【0035】

次いで、PCR産物の一部をとり、常法にしたがって、1% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動することによってDNA断片を分画し、ナイロン膜に転写し、0.4N水酸化ナトリウムにより固定し、2 $\times$ SSCにより洗浄し、風乾した後、6 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAをそれぞれ含有するプレハイブリダイゼーション液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。別途、常法にしたがって、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に基づき5'-GGRCANGGR TCYTT-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、これを[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識することによってプローブを調製した。前記ナイロン膜を浸漬したプレハイブリダイゼーション液にこのプローブを1 pmol加え、ナイロン膜を40℃でさらに20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた。その後、6 $\times$ SSCによりナイロン膜を洗浄し、常法にしたがってオートラジオグラフィーした。その結果、プローブの特異的なハイブリダイゼーションを示すシグナルが認められ、上記PCR産物が目的とするDNA断片を含むことが確認された。

# 【0036】

その後、残りのPCR産物にプラスミドベクター（商品名『pCR-Script Cam SK (+)』、ストラタジーン社製造）を1 ng加え、DNAライゲーション・キット（商品名『DNAライゲーション・キット/バージョン2』、宝酒造株式会社製造）を用いてプラスミドベクター内にPCR産物であるDNA断片を挿入した。反応物の一部をとり、大腸菌株（商品名『XL1-Blue MRF' Kan』、ストラタジーン社製造）を形質転換した後、形質転換体



をクロラムフェニコール  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む LB 培地 (pH 7.5) に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 18 時間培養し、培養物から菌体を採取し、これを常法にしたがって処理してプラスミド DNA を採取した。ジデオキシ法により調べたところ、このプラスミド DNA は、PCR 産物の DNA 断片の塩基配列として、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列を含んでいた。その塩基配列がコードする、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列と、配列表における配列番号 3 乃至 23 に示す、実施例 1-2 乃至 1-3 で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列はいずれも、その全部又は一部が配列番号 1 に示すアミノ酸配列に含まれていた。このことは、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードする DNA が、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列を含有するものであることを示している。

【0037】

【実施例 3】

〈マウス由来の IL-18 結合蛋白質〉

【0038】

【実施例 3-1】

〈IL-18 結合蛋白質の調製〉

コリネバクテリウム・パルバム (ATCC 11827) を  $60^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱して得た死菌体を 8 週齢の雌 CD-1 マウス 600 匹の腹腔内に  $1 \text{ mg}/\text{匹}$  の割合で注射投与し、通常の方法で 7 日間飼育した後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を  $1 \mu\text{g}/\text{匹}$  の割合で注射投与した。2 時間後、マウスの心臓から血液を採取し、これを常法にしたがって処理して血清  $200 \text{ ml}$  を得た。その後、この血清を実施例 1-1 の方法により精製したところ、マウス由来の精製 IL-18 結合蛋白質が約  $3 \mu\text{g}$  得られた。

【0039】

その後、この精製 IL-18 結合蛋白質につき、ジチオトレイトール存在下の SDS-PAGE により分子量を測定したところ、約 40,000 乃至 60,000 ダルトンに IL-18 結合能を伴う蛋白質の単一バンドが観察された。なお、大麦胚芽レクチンをリガンドとする『ウィート・ジャーム・レクチン・セファ

ロース 6MB』に吸着することは、本例の IL-18 結合蛋白質が糖蛋白質であることを示している。

【0040】

【実施例 3-2】

〈ペプチドマッピング〉

実施例 3-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質につき、実施例 1-3 におけると同様にしてペプチドマップを作成するとともに、トリプシン消化により得られたペプチド断片 1 乃至 5 及びトリプシン/ペプシン消化により得られたペプチド断片 6 乃至 8 のアミノ酸配列を調べたところ、ペプチド断片 1 乃至 8 は、それぞれ、配列表における配列番号 24 乃至 31 に示すアミノ酸配列を有していた（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。このとき得られたペプチドマップを図 2 に示す。

【0041】

【実施例 3-3】

〈IL-18 抑制作用〉

14 週齢の雌 C3H/HeJ マウスから脾臓を摘出し、分散し、付着細胞を除去した後、脾細胞を 10% (v/v) ウシ胎児血清を補足した RPMI-1640 培地 (pH 7.4) に細胞密度  $1 \times 10^7$  個/ml になるように浮遊させ、免疫担当細胞とした。次いで、脾細胞及び  $2.5 \mu\text{g/ml}$  コンカナバリン A をマイクロプレートにそれぞれ 0.15 ml/ウェル及び 0.05 ml ずつ分注し、組換え型マウス IL-18 を  $25 \text{ ng/ml}$  と、IL-18 に対して過剰量の、実施例 3-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質とを含む新鮮な同一培地を 0.05 ml/ウェル加えた後、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、37℃で 24 時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を 0.1 ml ずつ採取し、産生した IFN- $\gamma$  を通常の酵素免疫法により測定した。併行して、IL-18 結合蛋白質及びマウス IL-18 のいずれかを省略した系をそれぞれ設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- $\gamma$  の標準品には、米国国立衛生研究所から入手した標準マウス IFN- $\gamma$  (Gg02-901-533) を用い、国際単位 (IU) に換算して表示した。

## 【0042】

その結果、IL-18結合蛋白質を省略した対照におけるIFN- $\gamma$ の産生量が約600 IU/mlであり、また、マウスIL-18を省略した対照におけるIFN- $\gamma$ の産生量が0 IU/mlであったのに対して、IL-18結合蛋白質を加えた系においては、僅かに60 IU/ml前後であった。このことは、本例のIL-18結合蛋白質がIL-18の生理作用を抑制することを示している。

## 【0043】

## 【実施例4】

〈マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA〉

コリネバクテリウム・パルバム(ATCC 11827)を60℃で1時間加熱し、得られた死菌体を8週齢の雌CD-1マウスの腹腔内に1 mg/匹の割合で注射投与した。7日間飼育した後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1  $\mu$ g/匹の割合で注射投与し、2時間後、頸椎を脱臼させて屠殺し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を湿重で3 gとり、これを6Mグアニジンイソチオシアナート、10 mMクエン酸ナトリウム及び0.5% (w/v) SDSからなる混液(pH 7.0) 20 mlに浸漬し、ホモゲナイザーにより破碎した。次いで、35 ml容遠心管に5.7M塩化セシウムを含有する0.1M EDTA (pH 7.5) を25 mlずつ注入し、その上部に細胞破碎物を10 mlずつ重層し、この状態で20℃、25,000 rpmで20時間超遠心分離した。その後、RNA画分を採取し、これを15 ml容遠心管にとり、等量のクロロホルム/イソブタノール混液(体積比4:1)を加え、5分間振盪し、4℃、10,000 rpmでさらに10分間遠心分離した後、水層部を採取した。採取した水層に2.5倍容のエタノールを加え、-20℃で2時間静置することによって全RNAを沈澱させた後、沈澱を採取し、75% (v/v) 水性エタノールで洗浄し、滅菌蒸留水0.5 mlに溶解した。

## 【0044】

以後、この全RNAを実施例2におけると同様にして逆転写酵素反応させ、得られた第一ストランドcDNAを含む反応物を、センスプライマーとして、配列表における配列番号27に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-GCN

GTNCCNACNAA-3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号30に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-GTYTTNARNCCRTC-3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた以外は実施例2におけると同様にしてPCR反応させた。その後、プローブの調製に、配列表における配列番号24に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-SWNGTRTGNCCTCYTT-3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた以外は、実施例2におけると同様にしてPCR産物中に目的とするDNA断片が存在することを確認する一方、実施例2におけると同様にして当該DNA断片の塩基配列を調べたところ、当該DNA断片は配列表における配列番号33に示す塩基配列を有していた。その塩基配列がコードする、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列と、配列表における配列番号24乃至31に示す、実施例3-2で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列はいずれも、その全部又は一部が配列番号2に示すアミノ酸配列に含まれていた。このことは、マウス由来の当該IL-18結合蛋白質をコードするDNAが、配列表における配列番号33に示す塩基配列を含有するものであることを示している。

【0045】

【実施例5】

〈液剤〉

安定剤としてパイロジェン除去した結晶性トレハロース粉末（商品名『トレハオース』、株式会社林原商事販売）を1%（w/v）含む生理食塩水に実施例1-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質を1mg/mlになるように溶解した後、常法にしたがって除菌して液剤を得た。

【0046】

安定性に優れた本品は、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤、点鼻剤などとして有用である。

【0047】

【実施例 6】

〈乾燥注射剤〉

安定剤としてパイロジェン除去したシュクロースを 1 % (w/v) 含む生理食塩水 100 ml に実施例 1-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を 100 mg 溶解し、常法にしたがって除菌した後、バイアル瓶に 1 ml ずつ分注し、凍結乾燥し、密栓した。

【0048】

安定性に優れた本品は、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

【0049】

【実施例 7】

〈軟膏剤〉

滅菌蒸留水にカルボキシビニルポリマー（商品名『ハイビスワコー』、和光純薬工業株式会社製造）及びパイロジェンを除去した結晶性トレハロース粉末（商品名『トレハオース』、株式会社林原商事販売）をそれぞれ濃度 1.4 % (w/w) 及び 2.0 % (w/w) になるように溶解し、実施例 1-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を均一に混合した後、pH 7.2 に調整して、1 g 当り IL-18 結合蛋白質を約 1 mg 含むペースト状物を得た。

【0050】

延展性と安定性に優れた本品は、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための軟膏剤として有用である。

【0051】

【実施例 8】

〈錠剤〉

パイロジェンを除去した無水結晶  $\alpha$ -マルトース粉末（商品名『ファイントース』、株式会社林原商事販売）に実施例 1-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質及び細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られた混合物を常法にしたがって打錠して、製品 1 錠（約 200 mg）当り IL-18 結合蛋白質及びルミンをそれぞれ約 1 mg 含む錠剤を得た。

【0052】

摂取性、安定性に優れ、細胞賦活作用も兼備する本品は、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【0053】

【実験】

＜急性毒性試験＞

常法にしたがって、5週齢のd d yマウス（体重20乃至25g）に実施例1-1及び3-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質を経口投与するか、腹腔内又は静脈内に注射投与した。その結果、両精製IL-18結合蛋白質のLD50は、いずれの投与経路によっても、約1mg/マウス体重以上であった。ことことは、この発明のIL-18結合蛋白質がヒトを含む哺乳類に投与する医薬品に配合して安全であることを物語っている。

【0054】

【発明の効果】

以上説明したとおり、この発明はIL-18に結合する新規な蛋白質の発見に基づくものである。この発明の蛋白質は、ヒトを含む哺乳類において、免疫系を活性化するIL-18の生理作用を抑制する性質を有するので、臓器移植に伴う拒絶反応の緩和や、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。

【0055】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：137

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser

1

5

10

15

Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys  
 20 25 30  
 Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu  
 35 40 45  
 Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn  
 50 55 60  
 Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr  
 85 90 95  
 Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala  
 100 105 110  
 Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val  
 115 120 125  
 Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln  
 130 135

【0056】

配列番号：2

配列の長さ：117

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys  
 20 25 30  
 Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser  
 35 40 45  
 Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg

50 55 60  
 Glu His Arg Asn Thr Ser Thr Trp Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ser Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val  
 85 90 95  
 Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp  
 100 105 110  
 Asp Gly Leu Lys Thr

115

【0057】

配列番号：3

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Thr Pro Val Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ala Xaa Val Arg Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Lys Asp Pro Cys Pro

20

【0058】

配列番号：4

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys

1

5



【0059】

配列番号 : 5

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys

1 5 10

【0060】

配列番号 : 6

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg

1 5

【0061】

配列番号 : 7

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : N末端フラグメント

配列

Thr Pro Val Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ala Ser Val Arg

1 5 10 15

【0062】

配列番号 : 8

配列の長さ : 23

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Xaa Leu Pro

1 5 10 15

Xaa Xaa Gln Glu Ala Leu Pro

20

【0063】

配列番号 : 9

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Xaa Xaa Ala

1 5 10

【0064】

配列番号 : 10

配列の長さ : 29

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Xaa Xaa Xaa Phe

1 5 10 15

Xaa Xaa Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg

20

25

【0065】

配列番号 : 11

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Gln Cys Pro Ala Xaa Glu Val Thr Trp Xaa Glu Val

1 5 10

【0066】

配列番号 : 12

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg

1 5

【0067】

配列番号 : 13

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Leu Val Asp Pro Glu Gln

1 5

【0068】

配列番号 : 14

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg

1

5

【0069】

配列番号 : 15

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

His Val Val Leu

1

【0070】

配列番号 : 16

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu

1

5

【0071】

配列番号 : 17

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu

1 5

【0072】

配列番号：18

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly

1 5

【0073】

配列番号：19

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Phe Pro Asn Phe

1

【0074】

配列番号：20

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly Xaa Phe

1 5

【0075】

配列番号：21

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu Val Thr Xaa Xaa Glu Val

1 5

【0076】

配列番号：22

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly Xaa Phe

1 5

【0077】

配列番号：23

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Xaa Xaa Val Ala Xaa Xaa Arg Phe Pro Asn Phe

1 5 10

【0078】

配列番号：24

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg

1 5

【0079】

配列番号：25

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu His Arg Xaa Thr Ser Thr Trp Leu His Arg

1 5 10

【0080】

配列番号：26

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu His Arg Xaa Thr Ser Thr Xaa Leu His

1 5 10

【0081】

配列番号 : 27

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Val Pro Thr Lys

1 5 10

【0082】

配列番号 : 28

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg

1 5 10

【0083】

配列番号 : 29

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg

1 5

【0084】

配列番号 : 30

配列の長さ : 6



配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Xaa Asp Gly Leu Lys Thr

1 5

【0085】

配列番号：31

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

His Ile Ile Leu

1

【0086】

配列番号：32

配列の長さ：411

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

起源

生物名：ヒト

組織の種類：肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号：mat peptide

存在位置：1..411

特徴を決定した方法：E

配列

ACA CCT GTC TCG CAG ACC ACC ACA GCT GCC ACT GCC TCA GTT AGA AGC	48
Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser	
1 5 10 15	
ACA AAG GAC CCC TGC CCC TCC CAG CCC CCA GTG TTC CCA GCA GCT AAG	96
Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys	
20 25 30	
CAG TGT CCA GCA TTG GAA GTG ACC TGG CCA GAG GTG GAA GTG CCA CTG	144
Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu	
35 40 45	
AAT GGA ACG CTG AGC TTA TCC TGT GTG GCC TGC AGC CGC TTC CCC AAC	192
Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn	
50 55 60	
TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC TTC ATT GAG CAC CTC	240
Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu	
65 70 75 80	
CCA GGC CGA CTG TGG GAG GGG AGC ACC AGC CGG GAA CGT GGG AGC ACA	288
Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr	
85 90 95	
GGT ACG CAG CTG TGC AAG GCC TTG GTG CTG GAG CAG CTG ACC CCT GCC	336
Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala	
100 105 110	
CTG CAC AGC ACC AAC TTC TCC TGT GTG CTC GTG GAC CCT GAA CAG GTT	384
Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val	
115 120 125	
GTC CAG CGT CAC GTC GTC CTG GCC CAG	411
Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln	
130 135	

【0087】

配列番号 : 33

配列の長さ : 351

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名 : マウス

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号 : mat peptide

存在位置 : 1..351

特徴を決定した方法 : E

配列

GCA GTC CCA ACT AAG CAG TAC CCA GCA CTG GAT GTG ATT TGG CCA GAA	48
Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu	
1 5 10 15	
AAA GAA GTG CCA CTG AAT GGA ACT CTG ACC TTG TCC TGT ACT GCC TGC	96
Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys	
20 25 30	
AGC CGC TTC CCC TAC TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC	144
Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser	
35 40 45	
TTC ATT GAG CAC CTT CCA GGC CGG CTG AAG GAG GGC CAC ACA AGT CGC	192
Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg	
50 55 60	
GAG CAC AGG AAC ACA AGC ACC TGG CTG CAC AGG GCC TTG GTG CTG GAA	240

Glu	His	Arg	Asn	Thr	Ser	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	
65					70					75					80	
GAA	CTG	AGC	CCC	ACC	CTA	CGA	AGT	ACC	AAC	TTC	TCC	TGT	TTG	TTT	GTG	288
Glu	Leu	Ser	Pro	Thr	Leu	Arg	Ser	Thr	Asn	Phe	Ser	Cys	Leu	Phe	Val	
					85					90					95	
GAT	CCT	GGA	CAA	GTG	GCC	CAG	TAT	CAC	ATC	ATT	CTG	GCC	CAG	CTC	TGG	336
Asp	Pro	Gly	Gln	Val	Ala	Gln	Tyr	His	Ile	Ile	Leu	Ala	Gln	Leu	Trp	
					100					105					110	
GAT	GGG	TTG	AAG	ACA												351
Asp	Gly	Leu	Lys	Thr												
					115											

【図面の簡単な説明】

【図 1】

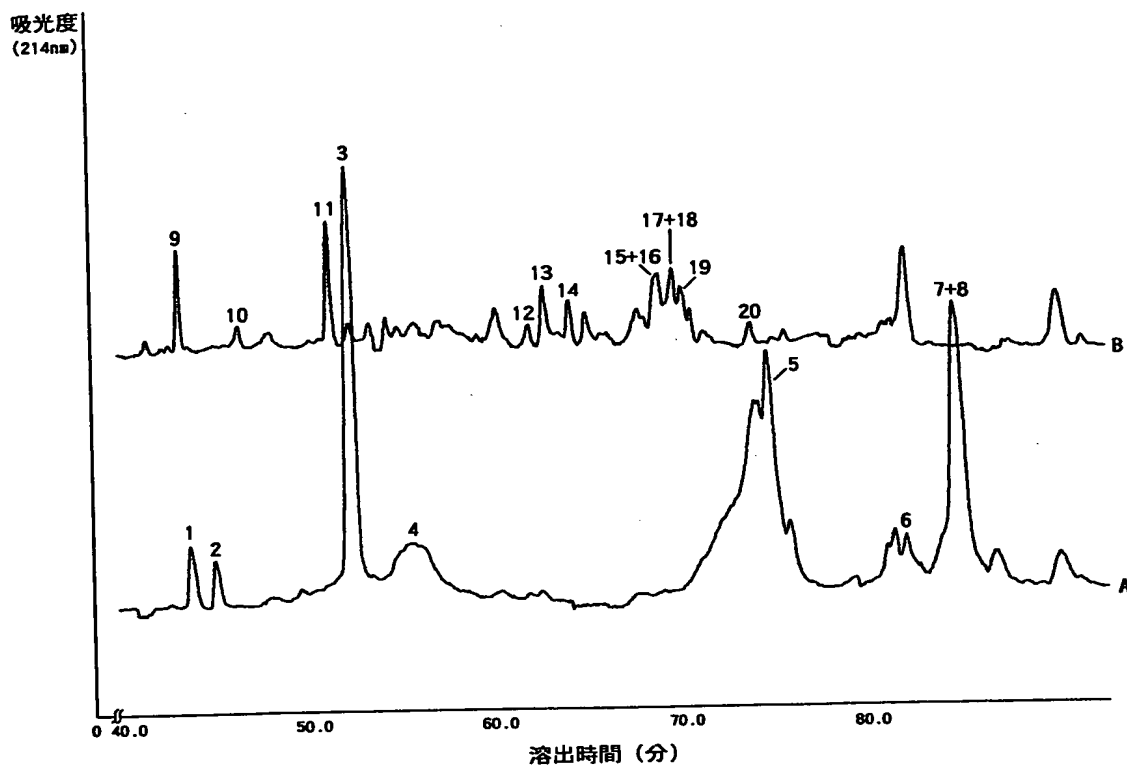
ヒト由来の IL-18 結合蛋白質のペプチドマップである。

【図 2】

マウス由来の IL-18 結合蛋白質のペプチドマップである。

【書類名】 図面

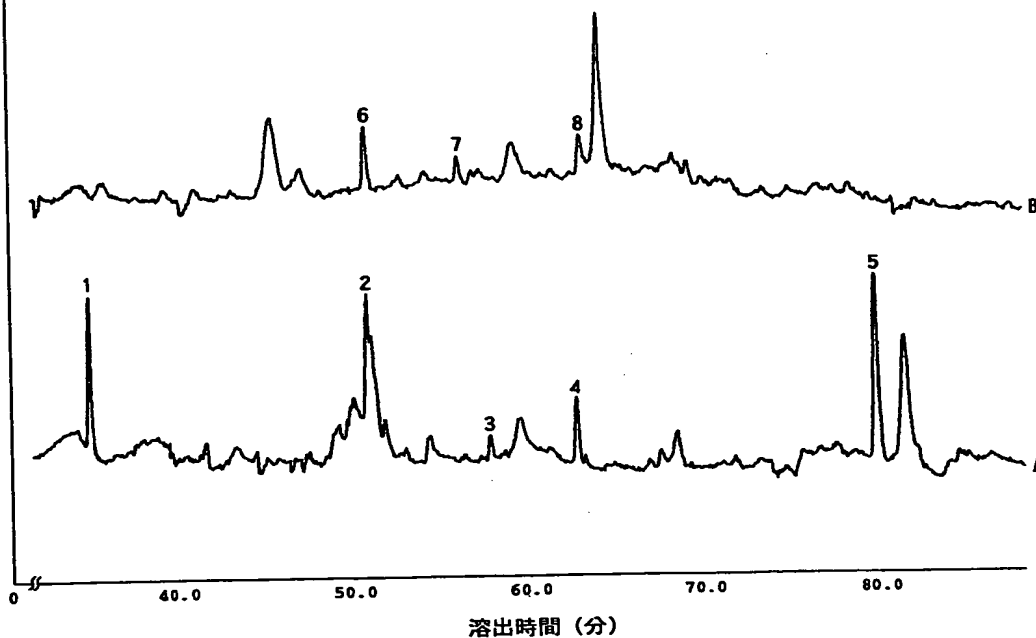
【図 1】



(註) クロマトグラムA及びクロマトグラムBは、それぞれ、トリプシン消化後及びトリプシン/ペプシン消化後に得られたペプチドマップである。図中、1乃至20は、それぞれ、アミノ酸配列を解析したペプチド断片1乃至20の溶出位置を示している。

【図 2】

吸光度  
(214nm)



(註) クロマトグラムA及びクロマトグラムBは、それぞれ、トリプシン消化後及びトリプシン/ペプシン消化後に得られたペプチドマップである。図中、1乃至8は、それぞれ、アミノ酸配列を解析したペプチド断片1乃至8の溶出位置を示している。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する物質とその用途、さらには、その物質をコードするDNAの提供を課題とする。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を含有するIL-18結合蛋白質と、その蛋白質をコードするDNAと、有効成分としてIL-18結合蛋白質を含有するIL-18抑制剤及び抗感受性疾患剤を提供することにより解決する。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000155908

【住所又は居所】

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

【氏名又は名称】

株式会社林原生物化学研究所



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000155908]

1. 変更年月日      1990年 8月31日  
[変更理由]      新規登録  
住 所      岡山県岡山市下石井1丁目2番3号  
氏 名      株式会社林原生物化学研究所
  
2. 変更年月日      1998年10月21日  
[変更理由]      住所変更  
住 所      岡山県岡山市下石井1丁目2番3号  
氏 名      株式会社林原生物化学研究所

